

ANALISIS POLIMORFISME GENETIK *Anopheles Aconitus Dönitz* (DIPTERA: CULICIDAE) DARI DAERAH ISTIMEWA YOGYAKARTA DAN JAWA TENGAH DENGAN RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA (RAPD) – PCR

GENETIC POLYMORPHISM ANALYSIS OF ANOPHELES ACONITUS DÖNITZ (DIPTERA: CULICIDAE) FROM DAERAH ISTIMEWA YOGYAKARTA AND JAWA TENGAH BY USING RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA (RAPD) - PCR

Novia Gesriantuti¹, Jesmandt Situmorang² dan F.A. Sudjadi³

Program Studi Biologi

Program Pascasarjana Universitas Gadjah Mada

ABSTRACT

The objective of this research was to investigate genetic polymorphism of mosquito *Anopheles aconitus Dönitz* from coastal area (Patehan & Panjatan), lowland (Salaman & Minggir) and upland (Sawangan & Pakem) using Random Amplified Polymorphic DNA - Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR). The research was conducted at the Biochemistry Laboratory, Inter-University Center, Gadjah Mada University, Yogyakarta on February - Juli 2000.

The research was conducted in two steps, i.e. field collection of mosquitoes and DNA isolation based on the procedure given by Hoelzel (1994) with modification by Anggreini (1998), DNA amplification and electrophoresis in the laboratory. The research used three primer, i.e. E-16, E-17 and F-04.

The results of this research indicated that the specific DNA bands to the whole research locations were 227 bp (base pair), 303 bp and 436 bp (E-16), 364 bp, 1005 bp, and 2983 bp (E-17). Thus, these primers were potentially to be used for identification (taxonomic keys) of the *An. aconitus*. The specific bands for mosquitoes sample from each research location were not found. Genetic variation of *An. aconitus* from coastal area, lowland and upland was genotype polymorphism (intrapopulation). Quantitative DNA bands analysis indicated that the sample of mosquito from coastal area had the highest level, i. e. 80%, then consecutively followed by samples of mosquito from upland and lowland being 73,13% and 72,93% respectively.

Keywords : *An. aconitus*, genetic polymorphism, different habitat, RAPD-PCR

¹ Jln. Angkasa Puri Ujung No.2, Kel. Pampuk Tabing - Padang

² Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada

³ Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada

PENGANTAR

Malaria disebabkan oleh parasit yang dikenal sebagai *Plasmodium*. Protozoa parasit darah ini ditularkan oleh nyamuk vektor dari genus *Anopheles* Meigen. Kira-kira 420 spesies *Anopheles* telah diidentifikasi dan 70 spesies dianggap sebagai vektor malaria di dunia (Subbarao, 1998). Salah satu di antara spesies itu adalah *Anopheles aconitus* Dönitz yang merupakan vektor utama penyakit malaria di Pulau Jawa (Dharmawan, 1993). Kira-kira 23 spesies *Anopheles* yang merupakan vektor malaria telah diidentifikasi sebagai spesies kompleks (Reid, 1968; Subbarao, 1998).

Dalam perkembangan terakhir, variasi genetik populasi untuk mengenali spesies kompleks, sibling, kriptik, isomorfik lebih banyak dikaji dengan pemeriksaan DNA, yaitu dalam taksonomi molekuler. Polimorfisme DNA dapat di-gunakan untuk analisis beberapa jenis organisme yang berbeda. Metode yang menunjukkan polimorfisme DNA dapat digunakan untuk mengidentifikasi ke-anekaragaman pada individu secara langsung pada tingkat DNA. Keanekaragaman ini dapat dideteksi dengan metode RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) dan RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Haymer, 1995). RAPD dapat menunjukkan polimorfisme yang sangat tinggi dari DNA hasil amplifikasi. Polimorfisme DNA itu dapat diidentifikasi dengan efisien dan cepat (Grosberg *et al.*, 1996). Pada metode RAPD ini oligonukleotida yang pendek bertindak sebagai primer melalui pengikatan daerah yang komplemen dengan proses amplifikasi daerah-daerah spesifik genom dengan menggunakan reaksi PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Pita DNA hasil amplifikasi dapat digambar dan gambar ini akan digunakan untuk analisis variasi genetik.

Nyamuk *An. aconitus* merupakan salah satu vektor penyebab penyakit malaria yang penting (utama) di Pulau Jawa (Reid, 1968; Anonim, 1990; Dharmawan, 1993). Nyamuk *An. aconitus* banyak ditemukan di daerah per-sawah dan irigasi, tetapi setelah dilakukan beberapa kali penangkapan nyamuk di berbagai tempat ternyata *An. aconitus* juga ditemukan di pantai dan dataran tinggi dalam jumlah yang banyak. Dengan tersebar di beberapa tempat yang berbeda, sangat memungkinkan terdapat variasi geografi atau ekologi di antara berbagai populasi di seluruh kisaran spesies ini. Hal itu akan mendorong terbentuknya variasi intraspesies yang mungkin bernilai taksonomis.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui sejauh mana terdapat perbedaan genetik atau variasi genetik (polimorfisme) nyamuk *An. aconitus* dari pantai, daratan rendah, dan daratan tinggi.

CARA PENELITIAN

Penelitian dilakukan dalam dua tahap, yaitu penelitian pendahuluan pada bulan Februari - Mei 2000 dan penelitian yang sesungguhnya pada bulan Juni - Juli 2000. Penelitian ini dilakukan di lapangan (Patehan, Panjatan, Salaman, Minggir, Pakem dan Sawangan), di Laboratorium Biokimia Pusat Antar Universitas, Universitas Gadjah Mada, sedangkan analisis data dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Tanaman Pangan, Cimanggu, Bogor.

Bahan penelitian yang digunakan adalah nyamuk *An. aconitus* dari pantai (Patehan, Panjatan), daratan rendah (Salaman, Minggir) dan daratan tinggi (Pakem, Sawangan). Bahan kimia yang digunakan untuk isolasi dan amplifikasi DNA adalah HCl, NaOH, EDTA, NaCl, Tris, Proteinase K (Promega), CTAB (Cationi chexa decetyl Trimetyl Amonium Bromide), Amonium asetat, Etanol absolut, Etanol 70%, Mercapto etanol, Fenol, Kloroform, Isoamil alkohol, KCl, Triton X-100 (Sigma), $MgCl_2$, dNTP (Promega), *Taq* DNA Polimerase (Hasil isolasi Sukarti M.), Primer Kit E, F (Operon), Mineral Oil, dH_2O , Agarosa, Ethidium bromide, TAE 1x dan *Loading buffer*.

Alat-alat yang dipakai adalah *waterbath*, *pellet pastle*, *vortex*, almari asam, sentrifus, almari pendingin, tabung *ependorf*, mikro pipet bermacam-macam ukuran beserta *tipnya* untuk isolasi DNA. Spektrofotometer elektroforesis melalui *agarose gel* digunakan untuk melihat hasil isolasi dan hasil amplifikasi DNA. Mesin PCR *Thermocycle* (COY), UV dan alat foto Polaroid serta alat-alat tulis digunakan untuk mengamplifikasi DNA. Aspirator dan *Paper cup* digunakan untuk menangkap dan menyimpan nyamuk.

1. Pengadaan Nyamuk *An. aconitus*

Nyamuk dewasa ditangkap pada kandang sapi kemudian diidentifikasi sesuai dengan Reid (1968) dan O'Connor & Soepanto (1979). Nyamuk dibunuh dengan memasukkannya ke dalam *freezer* suhu $-20^{\circ}C$, disimpan dalam alkohol 70% dan selanjutnya dapat digunakan sebagai bahan penelitian.

2. Isolasi DNA

DNA diisolasi dari keseluruhan tubuh nyamuk dewasa. Isolasi DNA dilaksanakan sesuai dengan prosedur yang diberikan oleh Hoelzel (1994), yaitu metode CTAB dan Anggreini (1998) dengan modifikasi sedikit, yaitu penambahan proteinase K ke dalam *buffer* lisis. Sodium asetat diganti dengan ammonium asetat dan larutan lisis dikurangi dari 500 μ L menjadi 200 μ L sesuai dengan larutan *buffer* ekstraksi DNA nyamuk dengan metode SDS (*Sodium Dodecyl Sulphate*).

Konsentrasi DNA diukur dengan cara melihat elektroforesis gel 1% pada larutan *buffer* TAE 1 x selama 1 jam dengan voltase 100 volt. Jika memberikan pita DNA yang masih apusan (*smear*), ditambah 1 μ L RNAase untuk masing-masing sampel dan diinkubasi pada suhu 37°C dalam *waterbath* selama satu jam. Setelah itu, sampel disimpan pada suhu -20°C, dan dapat digunakan untuk *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

3. *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

DNA genom yang diperoleh dari hasil isolasi, selanjutnya diamplifikasi dengan PCR. Konsentrasi dan komposisi zat-zat yang dipakai merupakan hasil optimasi yaitu : *buffer* PCR 10 x sebanyak 2,5 μ L; MgCl₂ 25 mM 2,5 μ L, dNTP 0,2 μ L (100 mM dari masing-masing dATP, dCTP, dGTP dan dTTP), *Taq* Polimerase 0,2 μ L (10 U/ μ L), DNA 3-5 μ L (sesuai dengan konsentrasi) serta ditambahkan *primer* 2,0 μ L (12 ng/ μ L). Untuk total volume 25 μ L ditambah H₂O steril, sebelum dimasukkan ke mesin PCR ditambahkan 25 μ L *mineral oil*. Setiap kali PCR digunakan kontrol negatif, yaitu semua campuran zat-zat PCR kecuali DNA, berguna untuk mendeteksi kontaminasi. Setiap komponen PCR dibuat dalam bentuk *aliquot*.

DNA genom diamplifikasi dengan *primer* Kit A, B, C, E, F, dan P dari teknologi Operon, Alameda CA. *Primer* dipilih apabila *primer* itu menghasilkan produk amplifikasi yang jelas dan mudah dibaca sehingga memudahkan mendiagnosis dan menganalisis DNA hasil amplifikasi. *Primer* ini dipakai secara tetap pada seluruh sampel yang dipakai dalam penelitian ini.

Siklus temperatur PCR yang digunakan pada penelitian ini adalah denaturasi awal pada suhu 94°C selama 4 menit 1 kali, denaturasi 94°C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 35°C selama 1 menit, polimerisasi pada suhu 72°C selama 2 menit sebanyak 45 siklus

dan polimerisasi akhir pada suhu 72°C selama 5 menit. Setelah itu, sampel disimpan pada suhu 4°C selama satu malam.

4. Elektroforesis

Hasil amplifikasi DNA dipisahkan pasangan basanya dengan menggunakan elektroforesis gel 1,2% pada larutan TAE 1 x (Sambrook et al., 1989). Sampel DNA yang telah diamplifikasi diambil 20 µL, ditambah dengan *loading buffer* dengan komposisi 5:2 (DNA:loading buffer), dan dihomogenkan dengan mikropipet agar bercampur rata. Kemudian, sampel dimasukkan ke dalam sumur elektroforesis gel. Ke dalam alat elektroforesis sebelumnya dimasukkan larutan TAE 1 x (40 µL Tris asetat, 1 mM EDTA). Etidium bromida yang dipakai sebagai alat bantu untuk melihat dibawah sinar UV dimasukkan ke dalam agarose sewaktu membuatnya sebanyak 300 µL (2 µL/mL). Berat molekul standar yang dipakai adalah DNA 1 kb ladder 5 µL. Alat elektroforesis dijalankan dengan beda potensial 50 volt selama 2,5 jam. Kemudian, gel dikeluarkan dari alat elektroforesis, lalu dilakukan pengamatan pita-pita DNA hasil amplifikasi dibawah sinar UV (ultra violet). Produk amplifikasi yang diamati itu kemudian difoto dengan film Polaroid 667. Untuk memudahkan pengamatan pita-pita DNA hasil amplifikasi, semua pita DNA yang teramplifikasi dipindahkan ke plastik transparan. Hal ini dilakukan segera setelah difoto, sebab pita-pita DNA yang terbentuk jika terlalu lama di bawah paparan sinar UV akan menghilang.

Analisis Produk RAPD

Pita-pita DNA yang terbentuk dari hasil amplifikasi diberi skor. Semua pita DNA dengan laju migrasi perpindahan/pergeseran yang sama diasumsikan sebagai lokus yang homolog. Pita-pita DNA yang ada diberi nilai 1 dan yang tidak ada diberi nilai 0. Berat molekul DNA hasil amplifikasi pasangan basanya dihitung dengan berpedoman pada migrasi DNA standar. Dalam penelitian ini DNA standar yang dipakai adalah DNA ladder 1 kb.

Penghitungan Pita DNA Spesifik (Unik) dan Polimorfisme

Pita-pita DNA yang selalu hadir pada semua sampel dari satu lokasi tertentu atau hadir pada semua sampel dari semua lokasi disebut pita DNA spesifik (unik). Pita DNA yang selalu hadir pada semua sampel nyamuk yang dibandingkan disebut pita DNA

monomorfisme, sedangkan pita DNA yang hadir pada beberapa sampel yang dibandingkan disebut pita DNA polimorfisme. Penghitungan dilakukan dengan membandingkan pita-pita DNA yang hadir pada masing-masing daerah penelitian, lalu dihitung persentasenya. Jumlah total pita DNA monomorfisme, polimorfisme, dan jumlah semua pita juga dihitung. Penghitungan ini dilakukan untuk masing-masing *primer*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Analisis Produk RAPD

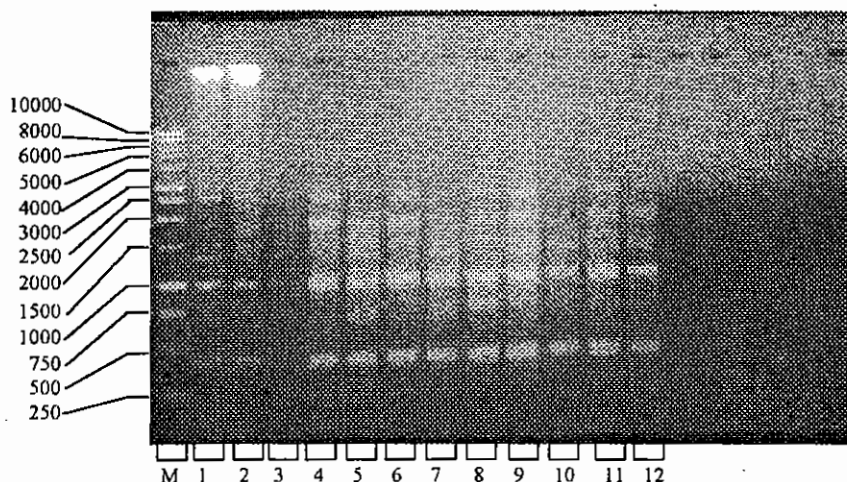
Hasil interpretasi pita DNA yang diamplifikasi dengan *primer* E-16 dan hasil elektroferogramnya, menunjukkan bahwa pita DNA hasil amplifikasi berukuran antara 227-2324 bp (Tabel 1 dan Gambar 1) Pada seluruh sampel ditemukan tiga pita spesifik (unik) untuk semua lokasi, yaitu pita yang berukuran 436 bp, 303 bp, dan 227 bp. Hal ini menunjukkan bahwa *primer* E-16 berpotensi untuk dapat digunakan sebagai kunci identifikasi taksonomi nyamuk *An. aconitus*. Kambhampati dan Black (1992) mengemukakan bahwa analisis pita yang unik dan spesifik dapat dihubungkan dengan karakter taksonomi, seperti diagnosa profil untuk identifikasi pada tingkat spesies dan populasi nyamuk.

Dengan penggunaan *primer* E-17 (Tabel 2 dan Gambar 2) dapat dilihat bahwa ukuran pita DNA teramplifikasi berkisar antara 364 bp - 3449 bp. Hasil amplifikasi menunjukkan adanya empat pita spesifik (unik) untuk seluruh lokasi, yaitu 2983 bp, 1670 bp, 1005 bp dan 364 bp. *Primer* E-17 dapat dijadikan sebagai penanda genetik untuk kunci identifikasi taksonomi nyamuk *An. aconitus*. Hadrys *et al.*, (1992) mengemukakan bahwa penganalisisan pita unik dan spesifik ada hubungannya dengan identitas taksonomi.

Tabel 1. Hasil Interpretasi Pita DNA atas Dasar Ada atau Tidak Pita DNA yang Diamplifikasi dengan primer E-16

Pita DNA (bp)	Sampel nyamuk											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2324	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0
1868	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0
1737	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0
1615	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0
1502	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1396	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
1207	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
1044	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
971	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
780	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0
675	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
436*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
303*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
227*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Keterangan: 1&2=sampel pantai (1&2 = Patehan, 3&4 = Panjatan), kolom 5-8 = sampel dataran rendah (5&6 = Salaman, 7&8 = Minggir), kolom 9-12 = sampel dataran tinggi (9&10 = Pakem, 11&12 = Sawangan). * = pita yang spesifik (unik)

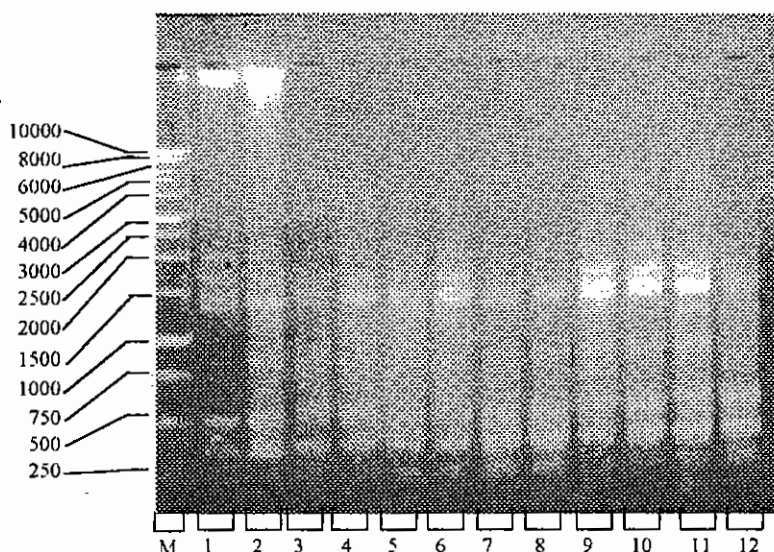


Gambar 1. Elektroferogram primer E-16; M =Marker, kolom 1-4=sampel pantai (1&2 = Patehan, 3&4 = Panjatan), kolom 5-8 = sampel dataran rendah (5&6 = Salaman, 7&8 = Minggir), kolom 9-12 = sampel dataran tinggi (9&10 = Pakem, 11&12 = Sawangan).

Tabel 2. Hasil Interpretasi Pita DNA atas Dasar Ada atau Tidak Pita DNA yang Diampifikasi dengan primer E-17

Pita DNA (bp)	Sampel nyamuk											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
3449	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
2983*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2232	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1
2076	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0
1931	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0
1670*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1444	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
1343	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1005*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
809	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
699	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
650	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
364*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Keterangan: 1-4=sampel pantai (1&2 = Patehan, 3&4 = Panjatan), kolom 5-8 = sampel dataran rendah (5&6 = Salaman, 7&8 = Minggir), kolom 9-12 = sampel dataran tinggi (9&10 = Pakem, 11&12 = Sawangan).
*= pita yang spesifik (unik)



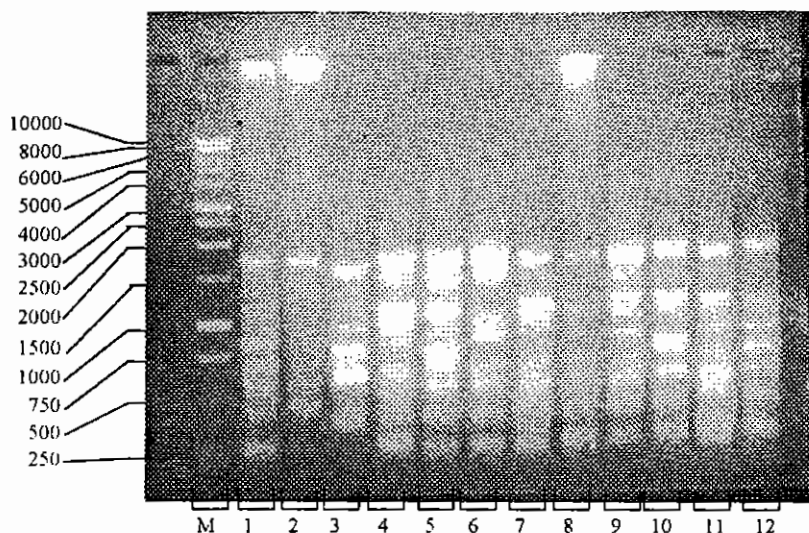
Gambar 2. Elektroferogram primer E-17; M =Marker, kolom 1-4=sampel pantai (1&2 = Patehan, 3&4 = Panjatan), kolom 5-8 = sampel dataran rendah (5&6 = Salaman, 7&8 = Minggir), kolom 9-12 = sampel dataran tinggi (9&10 = Pakem, 11&12 = Sawangan).

Dari hasil amplifikasi dengan primer F-04 didapat kisaran ukuran pita DNA yang dihasilkan antara 252 bp sampai 2031 bp (Tabel 3 dan Gambar 3). Disini tidak ditemukan pita spesifik (unik) untuk semua lokasi atau untuk lokasi tertentu.

Tabel 3. Hasil Interpretasi Pita DNA atas Dasar Ada atau Tidak Pita DNA yang Diampifikasi dengan primer F-04

Pita DNA (bp)	Sampel nyamuk											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2031	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1894	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1648	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0
1538	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
1338	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
1248	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0
1164	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1
1086	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0
1013	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1
945	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0
882	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
822	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1
767	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0
716	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
667	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1
623	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
581	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0
542	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0
505	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0
471	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1
440	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
410	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
383	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0
357	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
311	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
290	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
270	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
252	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Keterangan: 1-4=sampel pantai (1&2 = Patehan, 3&4 = Panjatan), kolom 5-8 = sampel dataran rendah (5&6 = Salaman, 7&8 = Minggir), kolom 9-12 = sampel dataran tinggi (9&10 = Pakem, 11&12 = Sawangan).



Gambar 3. Elektroferogram primer F-04; M =Marker, kolom 1-4=sampel pantai (1&2 = Patehan, 3&4 = Panjatan), kolom 5-8 = sampel dataran rendah (5&6 = Salaman, 7&8 = Minggir), kolom 9-12 = sampel dataran tinggi (9&10 = Pakem, 11&12 = Sawangan).

Dari ketiga primer yang digunakan ada 1 (satu) primer yang tidak menghasilkan pita DNA spesifik (unik), yaitu primer F-04. Hasil amplifikasi dengan primer itu dapat dikatakan cenderung untuk merupakan pita DNA spesifik (unik) untuk semua lokasi. Hal itu dapat dilihat pada pita ukuran 2031 bp pada primer F-04. Pada pita itu terdapat hanya satu sampel dengan nilai 0 (pita tidak muncul). Demikian juga, pada hasil amplifikasi primer F-04 cenderung didapat pita spesifik (unik) untuk sampel nyamuk yang berasal dari dataran tinggi, yaitu pita ukuran, 1013 bp dan 311 bp pada primer F-04. Pada masing-masing pita terdapat satu sampel dengan nilai 0 (pita tidak muncul). Hal ini mungkin disebabkan oleh beberapa hal, seperti terjadinya degradasi pada DNA sampel yang digunakan. Haymer (1995) mengemukakan bahwa variasi dan intensitas pita-pita yang teramplifikasi disebabkan oleh perubahan nukleotida yang mencegah amplifikasi dan delesi pada pelekatan primer terlalu jauh untuk menyokong amplifikasi serta inersi dan delesi yang mengubah produk amplifikasi. Dengan demikian maka pita DNA itu belum dapat dipercayai sebagai pita DNA yang spesifik (unik) untuk seluruh lokasi atau untuk lokasi tertentu.

2. Analisis Polimorfisme DNA

Berdasarkan perbedaan dan persamaan pola pita DNA hasil amplifikasi yang telah dilakukan terhadap sampel DNA nyamuk dari seluruh lokasi dengan semua primer, dapat dihitung persentase monomorfisme dan polimorfisme setiap lokasi (Tabel 4.) Polimorfisme paling tinggi didapat pada daerah pantai, yaitu 80%, diikuti oleh dataran tinggi 73,13%, dan dataran rendah 72,93%. Dari hasil itu dapat dikatakan bahwa nyamuk pada semua lokasi itu memiliki keanekaragaman yang cukup tinggi. Organisme yang memiliki keanekaragaman yang bervariasi akan lebih mudah lulus hidup dan berkembang biak, sehingga populasi di alam mempunyai kepadatan yang tinggi. Organisme vektor memungkinkan semakin banyak peluang untuk kontak dengan hospes untuk menghisap darah dan berpengaruh terhadap penularan penyakit antar-hospes yang digigit. Wallis *et al.*, (1984) mengemukakan bahwa ada hubungan antara keanekaragaman dengan adaptasi untuk lulus hidup. Pada umumnya semakin tinggi tingkat keanekaragaman genetik suatu organisme, semakin tinggi pula kemampuan organisme itu untuk dapat menyesuaikan diri dengan perubahan lingkungan, dan lokasi geografi juga dapat mempengaruhi tingkat keanekaragaman genetik suatu organisme.

Tabel 4. Perbandingan Persentase Pita DNA yang Monomorfisme dan Poli-morfisme Masing-masing Lokasi

Lokasi	Primer	Mono-morfisme	Jumlah total monomorfisme	Poli-morfisme	Jumlah total poliorfisme	Total pita DNA
Pantai	E-16	4		6		
	E-17	4	8	5	32	40
	F-04	0	(20%)	21	(80%)	
Dataran Rendah	E-16	4		7		
	E-17	3	10	6	27	37
	F-04	3	(27,03%)	14	(72,93%)	
Dataran Tinggi	E-16	4		7		
	E-17	5	11	3	30	41
	F-04	2	(26,83%)	20	(73,13%)	

KESIMPULAN

1. Terdapat variasi genetik *An. aconitus* dari pantai (Patehan & Panjatan), dataran rendah (Salaman & Minggir), serta dataran tinggi (Pakem & Sawangan) dalam bentuk polimorfisme genotip (intrapopulasi).

a. Ukuran pita DNA nyamuk *An. aconitus* yang dapat diamplifikasi dengan 3 primer (E-16, E-17 dan F-04) berkisar antara 178 dengan 4121 bp.

b. Pita DNA spesifik (unik) untuk semua lokasi sampel nyamuk adalah 227 bp, 303 bp, dan 436 bp (primer E-16), 364 bp, 1005 bp, 1760 bp, dan 2983 bp (primer E-17). Kedua primer ini berpotensi untuk digunakan sebagai identifikasi (kunci taksonomi) nyamuk *An. aconitus*.

2. Analisis pita DNA secara kualitatif menunjukkan tingkat polimorfisme untuk daerah pantai 80%, dataran tinggi 73,13%, dan untuk dataran rendah 72,93%.

DAFTAR PUSTAKA

- Anggreini, E. 1998. *Analisis Tingkat Keanekaragaman Genetik Nyamuk Aedes aegypti Dari Kotamadya Bandung dengan Menggunakan Metoda Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)*, Tesis S-2, Institut Teknologi Bandung, Bandung.
- Anonim. 1990. *Vektor Malaria di Indonesia*. Departemen Kesehatan (Dit.Jen. PPM dan PLP) Departemen Kesehatan R.I., Jakarta.
- Dharmawan, R. 1993. *Identifikasi Spesies Kembar Nyamuk Anopheles*. Sebelas Maret University Press, Surakarta.
- Grosberg, R.K., D.R. Levitan, and B.B. Cameron. 1996. "Characterization of Genetic Structure and Genealogies Use RAPD-PCR Marker : A Random Primer for the Novice and Nervous". In Ferraris, J.D., Palumbi, S.R. (Eds) *Molecular Biology: Advances, Strategies and Protocols*. Pp. 67-132, John Wiley & Sons. Inc. Publication, New York .
- Hadrys, H., Balick M., and Schierwater B. 1992. "Application of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in Molecular Ecology". *Molecular Ecology* 1: 55 - 63.

- Haymer, D.S. 1995. "Genetic Analysis of Laboratory and Wild Strain of the Melon Fly (Diptera : Tephritidae) Using Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction". *Ann. Entomol. Soc.* 88(5) : 705 - 710.
- Hoelzel, A.R. 1994. *Molecular Genetic Analysis of Population, A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford.
- Kambamphati, S., Black, W.C. 1992. "Random Amplified Polymorphics DNA of Mosquito Species and Populations (Diptera : Culicidae); Techniques, Statisitcal Analysis and Applications". *J.Med. Entomol.* 29(6): 939 - 945.
- O'Connor, C.T dan A. Soepanto. 1979. *Kunci Bergambar untuk Anopheles dari Indonesia*. P3M DepKes R.I., Jakarta.
- Reid, J.A. 1968. *Anopheles Mosquitoes of Malaya and Borneo*. Studies from The Institute for Medical Research Malaysia No.31. Government of Malaysia.
- Sambrook, J.E., E.F. Fritscly, and T. Mamatis. 1989. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Subbarao, S.K. 1998. "Anopheline Species complexes in South-East Asia". In Technical Publication, SEARO No:18. World Health Organization Regional Office for South-East Asia. New Delhi.
- Wallis, G.P., Tabanick, W.J. and Powel, J.P. 1984. "Genetic Heterogenity Among Carabean Populations of *Aedes aegypti*". *Am.J. Trop. Med. Hyg.* 33(3): 492 - 498.